

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 15/81, 15/62, 15/14 C12N 15/60, 1/21 // C12N 15/19 (C12N 1/21, C12R 1:645)</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 94/01569 (43) Date de publication internationale: 20 janvier 1994 (20.01.94)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00694 (22) Date de dépôt international: 6 juillet 1993 (06.07.93) (30) Données relatives à la priorité: 92/08428 8 juillet 1992 (08.07.92) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): MENART, Sandrine [FR/FR]; 62, résidence Courdimanche, F-91940 Les Ulis (FR). BOLOTIN, Monique [FR/FR]; Résidence de Courcelles, 160, avenue du Général-Leclerc, F-91190 Gif-sur-Yvette (FR).</p>		<p>(74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhone-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond Aron. F-92165 Antony Cédex (FR). (81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée Avec rapport de recherche internationale.</p>
<p>(54) Title: <i>K. LACTIS</i> PYRUVATE-DECARBOXYLASE PROMOTER GENE AND USE THEREOF (54) Titre: PROMOTEUR DU GENE DE LA PYRUVATE DECARBOXYLASE DE <i>K. LACTIS</i> ET SON UTILISATION (57) Abstract DNA sequences comprising all or part of the <i>K. lactis</i> pyruvate-decarboxylase promoter gene or a derivative thereof, and having transcriptional promoter activity. The invention also relates to the use of said sequences for the expression of recombinant genes. (57) Abrégé La présente invention concerne des séquences d'ADN comprenant tout ou partie du promoteur du gène (PDC1 de <i>K. lactis</i> ou d'un dérivé de celui-ci, et possédant une activité de promoteur transcriptionnel. Elle concerne également l'utilisation de ces séquences pour l'expression de gènes recombinés.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NE	Niger
BE	Belgique	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NO	Norvège
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IE	Irlande	PL	Pologne
BR	Brésil	IT	Italie	PT	Portugal
BY	Bélarus	JP	Japon	RO	Roumanie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SE	Suède
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	République slovaque
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
CN	Chine	LV	Lettonie	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	MC	Monaco	TC	Togo
CZ	République tchèque	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DE	Allemagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
ES	Espagne			VN	Viet Nam
FI	Finlande				

PROMOTEUR DU GENE DE LA PYRUVATE
DECARBOXYLASE DE *K. LACTIS* ET SON UTILISATION.

La présente invention concerne le domaine de la biologie moléculaire. Plus particulièrement, elle concerne une nouvelle séquence d'ADN présentant une activité de promoteur transcriptionnel, des vecteurs
5 d'expression contenant cette séquence, et son utilisation pour la production de protéines recombinantes, et par exemple de protéines hétérologues. L'invention concerne aussi les cellules recombinées contenant cette séquence d'ADN.

Les progrès accomplis dans le domaine de la biologie moléculaire ont
10 permis de modifier des microorganismes pour leur faire produire des protéines hétérologues. En particulier, de nombreuses études génétiques ont porté sur la bactérie *E.coli*. Toutefois, l'application industrielle de ces nouveaux modes de production est encore limitée, en particulier par les problèmes d'efficacité d'expression des gènes dans ces microorganismes
15 recombinés. Aussi, dans le but d'augmenter les performances de ces systèmes de production, des recherches ont été effectuées afin d'isoler des promoteurs forts, permettant d'obtenir des niveaux élevés d'expression de protéines hétérologues. Chez *E.coli*, on peut citer en particulier les promoteurs des opérons tryptophane et lactose.

20 Plus récemment, chez la levure *S.cerevisiae*, des études ont porté sur des promoteurs dérivés de gènes impliqués dans la glycolyse. On peut citer notamment les travaux sur le promoteur du gène de la 3-phosphoglycérate kinase PGK (Dobson et al., Nucleic Acid Res. 10, 1982, 2625; Hitzeman et al., Nucleic Acid Research 1982, 7791), sur celui du gène de la glyceral-
25 déhyde-3-phosphate deshydrogénase GAPDH (Holland et al., J.Biol.Chem. 254, 1979, 9839 ; Musti et al., Gene 25, 1983, 133), sur celui du gène de l'alcool deshydrogénase 1 ADH1 (Bennentzen et al., J.Biol.Chem. 257, 1982, 3018 ; Denis et al., J.Biol.Chem. 25, 1983, 1165), sur celui du gène de l'enolase 1 ENO1 (Uemura et al., Gene 45, 1986, 65), sur celui du gène GAL1/GAL10
30 [Johnston et Davis, Mol. Cell. Biol. 4 (1984) 1440) ou sur celui du gène CYC1 (Guarente et Ptashne, PNAS 78 (1981) 2199).

Récemment, des outils génétiques ont été développés afin de se servir de la levure *Kluyveromyces* comme cellule hôte pour la production de protéines recombinantes. La mise en évidence d'un plasmide de type

2-micron originaire de *K. drosophilorum* (plasmide pKD1 - EP 241 435) a permis d'établir un système hôte/vecteur très efficace pour la production de protéines recombinantes. (EP 361 991). Cependant, les promoteurs utilisés dans ce système n'ont pas été optimisés jusqu'à présent. En particulier, il s'agit essentiellement de promoteurs hétérologues, c'est-à-dire provenant d'autres microorganismes, tel que notamment *S.cerevisiae*. Cette situation peut engendrer différents inconvénients, et notamment limiter l'activité du promoteur à cause de l'absence de certains éléments de la machinerie transcriptionnelle (par exemple de trans-activateurs), présenter une certaine toxicité pour la cellule hôte due à une absence de régulation, ou affecter la stabilité du vecteur.

Dans ces conditions, le manque de promoteurs homologues forts chez *Kluyveromyces* constitue un facteur limitant dans l'exploitation industrielle de ce système d'expression.

La Demanderesse a maintenant identifié, cloné et séquencé une région du génome de *Kluyveromyces lactis* présentant une activité de promoteur transcriptionnel (voir SEQ ID n° 1). Plus précisément, cette région correspond au promoteur du gène codant pour la pyruvate-décarboxylase de *K. lactis* (KIPDC1). Cette région, ou des dérivés ou fragments de celle-ci, peut être utilisée de manière très performante pour la production de protéines recombinantes chez les levures du genre *Kluyveromyces*. Il est entendu que cette séquence peut également être utilisée dans d'autres organismes hôtes.

Par ailleurs, un avantage de la région promotrice obtenue réside dans l'absence de répression par le glucose, permettant une utilisation dans des milieux de culture classiques et industriels.

Un objet de la présente invention réside donc dans une séquence d'ADN comprenant tout ou partie de la séquence SEQ ID n° 1 ou de son brin complémentaire, ou d'un dérivé de celles-ci, et possédant une activité de promoteur transcriptionnel.

Au sens de la présente invention, on entend par dérivé, toute séquence obtenue à partir de la séquence SEQ ID n° 1 par modification(s) de nature génétique et/ou chimique, conservant une activité de promoteur. Par modification de nature génétique et/ou chimique, on entend toute mutation, délétion, substitution, addition, et/ou modification d'un ou plusieurs nucléotides. De telles modifications peuvent être effectuées dans différents

but, et notamment celui de préparer des promoteurs portables, ou celui de préparer des promoteurs adaptés à l'expression dans un type particulier de vecteur ou d'hôte, celui de réduire la taille, d'augmenter l'activité de promoteur de la transcription, de générer des promoteurs inductibles, d'améliorer le niveau de régulation, ou encore de changer la nature de la régulation. De telles modifications peuvent être effectuées par exemple par mutagénèse *in vitro*, par introduction d'éléments additionnels de contrôle ou de séquences synthétiques, ou par des délétions ou des substitutions des éléments originels de contrôle.

10 Lorsqu'un dérivé tel que défini ci-dessus est réalisé, son activité de promoteur transcriptionnel peut être mise en évidence de plusieurs façons, et en particulier en plaçant sous le contrôle de la séquence étudiée, un gène reporteur dont l'expression est détectable. Toute autre technique connue de l'homme de l'art peut bien évidemment être utilisée à cet effet.

15 La séquence SEQ ID n° 1 a été obtenue à partir d'une banque de fusion entre des fragments du génome de *K.lactis* 2359/152 et le gène lacZ de *E.coli* selon le protocole décrit dans les exemples. Il est entendu que l'homme du métier peut isoler cette région par hybridation au moyen d'une sonde comprenant tout ou partie de la séquence SEQ ID n° 1 ou de son brin complémentaire. Les dérivés selon l'invention peuvent ensuite être préparés à partir de cette séquence, comme indiqué dans les exemples.

Un autre objet de l'invention concerne un ADN recombinant comprenant une séquence d'ADN telle que définie ci-dessus.

25 Cet ADN recombinant peut contenir par exemple la séquence promotrice SEQ ID n° 1 ou un dérivé de celle-ci, dans laquelle est inséré un site de restriction, facilitant l'utilisation de cette séquence comme promoteur "portable" (SEQ ID n° 3).

Préférentiellement, cet ADN recombinant contient en outre un ou plusieurs gènes de structure. En particulier, il peut s'agir de gènes codant pour des protéines d'intérêt pharmaceutique ou agroalimentaire. A titre d'exemple, on peut citer les enzymes (tels que notamment la superoxyde dismutase, la catalase, les amylases, les lipases, les amidases, la chymosine, etc), les dérivés sanguins (tels que la sérum-albumine, l'alpha- ou la bêta-globine, le facteur VIII, le facteur IX, le facteur de von Willebrand, la fibronectine, l'alpha-1 antitrypsine, etc), l'insuline et ses variants, les

lymphokines (telles que les interleukines, les interférons, les facteurs de stimulation des colonies [G-CSF, GM-CSF, M-CSF...], le TNF, le TRF, etc), les facteurs de croissance (tels que l'hormone de croissance, l'érythropoïétine, le FGF, l'EGF, le PDGF, le TGF, etc), les apolipoprotéines, des polypeptides
5 antigéniques pour la réalisation de vaccins (hépatite, cytomégalovirus, Epstein-Barr, herpes, etc), ou encore des fusions de polypeptides telles que notamment des fusions comportant une partie active fusionnée à une partie stabilisatrice (par exemple des fusions entre l'albumine ou des fragments d'albumine et le récepteur ou une partie d'un récepteur de virus [CD4, etc.]).

10 Encore plus préférentiellement, l'ADN recombinant contient également des signaux permettant la sécrétion du produit d'expression du ou desdits gènes de structure. Ces signaux peuvent correspondre aux signaux naturels de sécrétion de la protéine considérée, mais ils peuvent être d'une origine différente. En particulier des signaux de sécrétion dérivés de gènes
15 de levure peuvent être utilisés, tels que ceux des gènes de la toxine killer (Stark et Boyd, EMBO J. 5 (1986) 1995) ou de la phéromone alpha (Kurjan et Herskowitz, Cell 30 (1982) 933; Brake et al., Yeast 4 (1988) S436).

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, l'ADN recombinant fait partie d'un plasmide d'expression, qui peut être à
20 réplication autonome ou intégratif.

En particulier, des vecteurs à réplication autonome peuvent être obtenus en utilisant des séquences à réplication autonomes chez l'hôte choisi. Notamment, chez la levure, il peut s'agir d'origines de réplication dérivées de plasmides (pKD1, 2 μ , etc), ou bien de séquences chromosomiques (ARS).

25 Les vecteurs intégratifs peuvent être obtenus notamment en utilisant des séquences homologues à certaines régions du génome de l'hôte, permettant, par recombinaison homologue, l'intégration du vecteur.

Un autre objet de l'invention concerne les cellules recombinées contenant une séquence d'ADN telle que définie ci-avant.

30 Avantageusement, les cellules sont choisies parmi les levures, et encore plus préférentiellement, parmi les levures du genre *Kluyveromyces*. Il est entendu cependant que l'invention couvre toutes les cellules recombinées dans lesquelles les régions promotrices de l'invention sont actives, qu'il s'agisse de cellules eucaryotes ou procaryotes. Ainsi, parmi les cellules
35 eucaryotes, on peut citer les cellules végétales, animales, les levures, ou les

champignons. En particulier, s'agissant de levures, on peut citer les levures du genre *Saccharomyces*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, ou *Hansenula*. S'agissant de cellules animales, on peut citer les cellules COS, CHO, Cl27, etc. Parmi les champignons susceptibles d'être utilisés dans la présente invention, on peut
5 citer plus particulièrement *Aspergillus* ssp. ou *Trichoderma* ssp. Comme hôtes procaryotes, on peut utiliser les bactéries telles que *Escherichia coli*, ou celles appartenant aux genres *Corynebacterium*, *Bacillus*, ou *Streptomyces*.

L'activité de promoteur de la transcription des séquences de l'invention dans ces différents hôtes peut être vérifiée par exemple en
10 introduisant dans la cellule hôte considérée un ADN recombinant comprenant, sous le contrôle de la séquence promotrice étudiée, un gène reporteur dont l'expression peut être mise en évidence dans l'hôte considéré.

Les cellules recombinées de l'invention peuvent être obtenues par toute méthode permettant d'introduire un ADN étranger dans une cellule. Il
15 peut s'agir notamment de transformation, électroporation, conjugaison, fusion de protoplastes ou toute autre technique connue de l'homme de l'art. S'agissant de la transformation, différents protocoles ont été décrits dans l'art antérieur. En particulier, elle peut être réalisée en traitant les cellules entières en présence d'acétate de lithium et de polyéthylène glycol selon la technique
20 décrite par Ito et al. (J. Bacteriol. 153 (1983) 163-168), ou en présence d'éthylène glycol et de diméthylsulfoxyde selon la technique de Durrens et al. (Curr. Genet. 18 (1990) 7). Un protocole alternatif a également été décrit dans la demande de brevet EP 361 991. S'agissant d'électroporation, elle peut être réalisée selon Becker et Guarentte (in : Methods in Enzymology Vol194
25 (1991) 182).

Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'une séquence telle que précédemment définie pour l'expression de gènes recombinés. Les séquences d'ADN selon l'invention peuvent en effet permettre une production à des niveaux élevés de protéines recombinantes.

30 Avantageusement, les séquences de l'invention peuvent être utilisées pour l'expression de gènes codant pour des protéines d'intérêt pharmaceutique ou agroalimentaire. A titre d'exemple, on peut citer les protéines énumérées précédemment.

La présente invention permet également la réalisation d'un procédé de production de protéines recombinantes, selon lequel on cultive une cellule recombinée telle que définie ci-avant et on récupère la protéine produite. A titre d'exemple de protéine, on peut citer les protéines énumérées précédemment.

Préférentiellement, le procédé de l'invention est applicable à la production de sérum-albumine humaine, ou un de ses variants moléculaires. On entend par variant moléculaire de l'albumine, les variants naturels résultant du polymorphisme de l'albumine, les formes tronquées, ou toute protéine hybride à base d'albumine.

D'autres avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

15

LEGENDE DES FIGURES

SEQ ID n° 1 : Séquence nucléotidique du fragment de 1,2 kb correspondant au promoteur KIPDC1 de K. lactis.

Figure 2 : Préparation du transposon Mini Mu MudIIZK1.

20 Figure 3 : Carte de restriction du transposon Mini Mu MudIIZK1.

Figure 4 : Carte de restriction du clone 1D12.

Figure 5 : Carte de restriction du fragment de BamHI-HindIII de 2,05 kb portant le promoteur KIPDC1.

25

TECHNIQUES GENERALES DE CLONAGE

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de

30

l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli* etc, sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds),
5 "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les enzymes de restriction ont été fournies par New England Biolabs (Biolabs), ou Pharmacia et sont utilisées selon les recommandations des fournisseurs.

10 Les plasmides de type pBR322 et pUC sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories).

Pour les ligatures, les fragments d'ADN sont séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en
15 présence de l'ADN ligase du phage T4 (Boehringer) selon les recommandations du fournisseur.

Le remplissage des extrémités 5' proéminentes est effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'*E. coli* (Boehringer) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes
20 est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

La mutagénèse dirigée *in vitro* par oligodéoxynucléotides synthétiques est effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids
25 Res. 13 (1985) 8749-8764].

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science
230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] est effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer
30 Cetus) selon les spécifications du fabricant.

La vérification des séquences nucléotidiques est effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467].

Les transformations de *K. lactis* sont effectuées par toute technique
35 connue de l'homme de l'art, et dont un exemple est donné dans le texte.

Sauf indication contraire, les souches bactériennes utilisées sont *E.coli* DH1 (Hanahan D., J. Mol. Biol. 166 (1983) 557) ou *E.coli* JM109::(Mucls) (Daignan-fornier et Bolotin-Fukuhara, Gene 62 (1988) 45).

Les souches de levures utilisées appartiennent aux levures
5 bourgeonnantes et plus particulièrement aux levures du genre *Kluyveromyces*.
Les souche *K. lactis* 2359/152 et *K. lactis* SD6 ont été particulièrement utilisées.

Les souches de levures transformées par les plasmides sont cultivées
en erlenmeyers ou en fermenteurs pilotes de 2l (SETRIC, France) à 28°C en
milieu riche (YPD: 1% yeast extract, 2% Bactopeptone, 2% glucose; ou YPL:
10 1% yeast extract, 2% Bactopeptone, 2% lactose) sous agitation constante.

EXEMPLES

I - Isolement du promoteur KIPDC1 de *K. lactis*.

15

La séquence SEQ ID n° 1 a été isolée à partir d'une banque de fusion
entre des fragments du génome de *K.lactis* 2359/152 et le gène lacZ de *E.coli*.
Cet exemple décrit en (A) la préparation de la banque de fusion, et en (B) la
sélection et la caractérisation d'un clone de cette banque portant le promoteur
20 du gène de la pyruvate décarboxylase de *K.lactis*.

A/ Préparation de la banque de fusion

A.1. Préparation du transposon Mini Mu MudIIK1 (figures 2 et 3).

Le Mini Mu MudIIK1 a été construit à partir du Mini Mu MudIIK1
25 décrit par Daignan-Fornier et Bolotin-Fukuhara (Gene 62 (1988) 45). Il a été
obtenu en substituant l'origine de répllication du mini transposon MudIIK1
par une origine de répllication fonctionnelle dans *Kluyveromyces* : l'origine de
répllication du plasmide pKD1 (EP231 435).

A.1.1. Construction d'une cassette portant l'origine de répllication du
30 plasmide pKD1 (fragment S11).

Afin de faciliter les manipulations ultérieures, le fragment S11 (portant l'origine de réplication du plasmide pKD1) a été mis sous forme d'une cassette NotI. Pour cela, un dérivé du plasmide pUC18 a été construit dans lequel les sites externes du multisite de clonage (sites HindIII et EcoRI) ont été changés en sites NotI. Cela a été fait par digestion avec l'enzyme correspondante, action de l'enzyme de Klenow et ligature avec un oligonucléotide synthétique correspondant à un site NotI [oligo d(AGCGGCCGCT); Biolabs]. Le plasmide obtenu est désigné pGM67. Le fragment S11 de 960 pb obtenu par digestion par l'enzyme Sau3A du plasmide KEp6 (Chen et al, Nucl. Acids Res. 114 (1986) 4471) a ensuite été inséré au site compatible BamHI du plasmide pGM67. Le plasmide ainsi obtenu désigné pGM68 contient, sous forme d'une cassette NotI, le fragment S11.

A.1.2. Suppression de l'origine de réplication 2 μ du transposon MudIIZZ1.

Le plasmide pGM15 portant le mini Mu MudIIZZ1 (Daignan-Fornier et Bolotin-Fukuhara précitée) a été délété des régions 2 μ par digestion au moyen de l'enzyme SalI. Le site SalI unique ainsi obtenu a ensuite été transformé en site NotI par ligature d'un oligonucléotide synthétique correspondant à un site NotI après action de l'enzyme de Klenow. Le plasmide résultant est appelé pGM59.

A.1.3. Insertion du fragment S11

La cassette NotI portant l'origine de réplication du plasmide pKD1 (fragment S11), provenant du plasmide pUC18 modifié a ensuite été introduite au site NotI unique du plasmide pGM59.

Le plasmide obtenu, désigné pGM83, porte un mini Mu, appelé MudIIZK1, qui est adapté à la levure *Kluyveromyces lactis*, ainsi qu'une copie fonctionnelle du gène LEU2 de *S.cerevisiae* capable de compléter une mutation leu2 chez *K.lactis* (Kämper et al, Curr. Genet. 19 (1991) 109). La carte de restriction du mini-mu MudIIZK1 est représentée sur la figure 3.

A.2. Introduction du Mini Mu MudIIK1 dans la souche *E.coli* portant le Mu helper JM109::(Mucts) : Obtention de la souche JM109::(Mucts)::(MudIIK1).

La souche JM109::(Mucts) a été transformée par le plasmide pGM83
5 contenant le mini mu MudIIK1 en présence de chlorure de calcium. Après transformation, la transposition a été induite par choc thermique selon la technique décrite par Castilho et al. (J. Bacteriol. 158 (1984) 488). Le lysat phagique obtenu après induction est ensuite utilisé pour surinfecter la souche JM109::(Mucts). La souche JM109::(Mucts) étant *recA*, l'ADN linéaire
10 encapsidé par le phage ne peut se refermer pour donner un plasmide répliquatif. Les intégrants [souche JM109::(Mucts)::(MudIIK1)] sont donc sélectionnés comme clones chloramphénicol résistants (Cm^R), ampicilline sensibles (Amp^S).

A.3. Préparation de la banque génomique de *K.lactis* dans *E.coli* DH1

15 L'ADN de haut poids moléculaire a été préparé à partir de la souche *K.lactis* 2359/152, et digéré partiellement par l'enzyme Sau3A. Les fragments d'une taille de 4 à 8 kb ont été récupérés sur gel d'agarose LMP ("Low Melting Point", SEAKEM) et clonés dans le plasmide pBR322 linéarisé par BamHI et déphosphorylé par action de la phosphatase intestinale de veau
20 (Biolabs). 35 pools de 1000 colonies dans *E.coli* DH1 ont ainsi été réalisés. Les 1000 colonies de chaque pool sont ampicilline-résistantes et tétracycline-sensibles, ce qui montre qu'elles ont toutes inséré un fragment d'ADN génomique de *K.lactis* dans pBR322.

A.4. Préparation de la banque de fusion

25 A.4.1. Introduction de la banque génomique de *K.lactis* dans la souche JM109::(Mucts)::(MudIIK1).

L'ADN plasmidique de chaque pool réalisé dans DH1 est extrait (Maniatis). Cet ADN est ensuite utilisé pour transformer la souche JM109::(Mucts)::(MudIIK1) en présence de chlorure de calcium. Pour être
30 représentatif des 1000 colonies contenues dans chaque pool de la banque génomique, plus de 3000 clones par pool ont été récupérés dans la souche JM109::(Mucts)::(MudIIK1) permettant la transduction.

A.4.2. Transposition du Mini Mu MudIIK1

La banque de fusion est réalisée par transposition extensive du Mini Mu MudIIK1 sur les plasmides formant la banque d'ADN génomique de *K.lactis*. Les mini-muductions ont été faites selon le protocole décrit par Castilho et al. (J. Bacteriol. 158 (1984) 488) et les transductants ont été sélectionnés sur milieu sélectif LBAC (milieu LB (Gibco BRL) supplémenté avec 50 mg/l d'ampicilline et 30 mg/l de chloramphénicol), le marqueur Amp^R étant apporté par le plasmide, et le marqueur Cm^R par le mini-mu. Pour chaque pool, des transpositions sont faites en série, et entre 10 000 et 20 000 transductants sont récupérés par pool. L'ADN des transductants est ensuite extrait d'une préparation de 100 ml, purifié par précipitation au polyéthylène glycol (Maniatis et al, 1989) et resuspendu dans 100µl d'eau. Cet ADN a ensuite été utilisé pour transformer *K.lactis* et sélectionner des clones portant des promoteurs.

15 B/ Isolement du promoteur KIPDC1 de *K.lactis*

L'ADN de fusion préparé ci-dessus a été utilisé pour transformer, par électroporation, une souche réceptrice de *K.lactis*. Cette souche réceptrice, désignée SD6, porte les mutations leu2 (correspondant au marqueur de sélection du mini-mu MudIIK1) et lac4-8. Cette dernière mutation empêche la souche de pousser sur un milieu contenant du lactose comme seule source de carbone, mais elle peut être complétée par la surexpression du gène lacZ d'*E.coli* codant pour la β-galactosidase (Chen et al., J. Basic Microbiol. 28 (1988) 211). De ce fait, l'expression d'une protéine fusionnée à la β-galactosidase doit permettre la croissance de la souche SD6 sur lactose après transformation. Ce crible positif a été utilisé pour sélectionner rapidement des clones portant des promoteurs forts.

B.1. Construction de la souche réceptrice *K.lactis* SD6.

La souche SD6 (Chen et al., Mol. Gen. Genet. 233 (1992) 97) a été obtenue par croisement de la souche *K.lactis* CXJ1-7A (a, lac4-8, ura3A, ade1-1, K1, K2, pKD1) (Chen et Fukuhara, Gene 69 (1988) 181) avec la souche AWJ-137 (leu2, trp1, homothallique) (Kämper et al, Curr. Genet. 19 (1991) 109), et sélection des spores ayant le génotype ADE⁺, uraA, leu2, lac4-8. Comme les

spores obtenues n'étaient pas capables de régénérer après transformation par protoplastes, un croisement retour a été fait avec la souche CXJ1-7A. Après sporulation en masse, les spores du génotype choisi ont été testées par transformation au chlorure de lithium avec le plasmide KEp6 selon une
5 technique dérivée de celle décrite par Ito et al. (J. Bacteriol. 153 (1983) 163) (la concentration en LiCl est de 20 mM, soit 10 fois moins que celle utilisée par Ito pour *S.cerevisiae*). La souche CXJ1-7A a servi de témoin de transformation.

La souche SD6, sélectionnée sur ces critères, se transforme correctement : 1 à 3 . 10⁴ transformants par µg d'ADN; et les transformants
10 ont une stabilité satisfaisante : 30 à 40% des colonies gardent le phénotype [Ura⁺] après 6 générations en milieu non sélectif.

B.2. Isolement du promoteur KIPDC1.

15 La souche SD6 a été transformée par électroporation selon Becker et Guarante (in Methods in Enzymology vol194 (1991) 182) (appareil Jouan; 2500 V/cm; 80-100 ng d'ADN/transformation) avec l'ADN de 11 pools de transductants obtenus en A.4.2. (correspondant à une banque de 11000 clones dans *E.coli*). Après 5 heures de régénération en milieu YPD (extrait de levure
20 10 g/l; peptone 10 g/l; glucose 20 g/l), les cellules ont été étalées sur milieu minimum lactose. Les transformants capables de pousser sur lactose ont été restreints et, pour chaque clone, le plasmide a été extrait, amplifié dans *E.coli*, et, après vérification rapide de la carte de restriction du vecteur et du mini-mu, utilisé pour retransformer la levure SD6. Parmi les clones de *K.lactis*
25 obtenus après retransformation, l'un d'entre-eux, le clone 1D12, a été étudié par restriction (voir figure 4) et par analyse de la séquence de la jonction entre la protéine de *K.lactis* et la β-galactosidase. Pour cela, la séquence de la jonction, à partir de l'extrémité lacZ du mini-mu (séquence double brin) a été déterminée par séquençage au moyen de l'oligonucléotide suivant situé à -59
30 nucléotides de la jonction :

5'-CTGTTTCATTTGAAGCGCG-3' (SEQ ID n° 2)

L'analyse de la séquence protéique déduite de la séquence
35 nucléotidique ainsi obtenue par comparaison avec les séquences de banques

de protéines d'autres levures ou eucaryotes (Genbank, MIPS, EMBL, etc), montre que la séquence portée par le clone 1D12 correspond au promoteur du gène de la pyruvate-décarboxylase de *Klactis*. Le fragment BamHI-HindIII de 2,05 kb contenant la région en amont de la fusion a ensuite été
5 sous-cloné dans le vecteur Bluescript KS+ (Stratagène), une carte de restriction a été faite (figure 5), et la séquence a été déterminée par délétions séquentielles sur 1,2 kb (SEQ ID n° 1). L'obtention d'éléments de séquence permet également à l'homme du métier de préparer des sondes spécifiques et de recloner la région promotrice de l'invention par hybridation selon les
10 techniques classiques de biologie moléculaire.

II - Transformation de *Kluyveromyces*.

Différentes techniques permettant l'introduction d'ADN dans la levure peuvent être utilisées.

15 Avantageusement, les différentes souches de *Kluyveromyces* utilisées ont été transformées en traitant les cellules entières en présence d'acétate de lithium et de polyéthylène glycol, selon la technique décrite par Ito et al. (J. Bacteriol. 153 (1983) 163-168). La technique de transformation décrite par Durrens et al. (Curr.Genet. 18 (1990) 7) utilisant l'éthylène glycol et le
20 diméthylsulfoxyde a également été utilisée. Il est aussi possible de transformer les levures par électroporation, par exemple selon la méthode décrite par Karube et al. (FEBS Letters 182 (1985) 90).

Un protocole alternatif a encore été décrit en détail dans la demande EP 361 991.

25 III - Utilisation du promoteur SEQ ID n° 1 pour l'expression de gènes hétérologues.

L'activité de promoteur transcriptionnel de la région de *Klactis* décrite sur la SEQ ID n° 1 a été mise en évidence lors même de son isolement, par sa
30 capacité à induire la complémentation de la mutation lac4-8 de la souche SD6. Cette capacité résulte en effet de l'expression du gène lacZ de *E.coli*, et démontre par là même la capacité d'expression de gènes hétérologues.

IV - Construction d'un promoteur KIPDC1 portable (SEQ ID n° 3)

Un promoteur portable est préparé par PCR, par insertion sur le fragment BamHI-HindIII de 2,05 kb d'un site de restriction HindIII en position +1 par rapport au codon ATG du gène KIPDC1 et des sites de restriction MluI et SalI à 1165 pb en amont (SEQ ID n° 3). Le produit de PCR
5 est cloné dans le vecteur pCRII (Invitrogen) pour générer le plasmide pYG175, permettant de ressortir le promoteur par simple digestion MluI-HindIII, facilitant ainsi le clonage dans un vecteur d'expression.

Un vecteur d'expression de la sérum-albumine humaine est ensuite
10 préparé à partir du plasmide pYG1018 comme suit : Le plasmide pYG1018 contient le gène prépro-albumine sous contrôle du promoteur LAC4. Il dérive du vecteur pYG1023 décrit dans la demande de brevet EP 402 212, par délétion du fragment BssHII-MluI portant le gène KIPGK. 5 µg des vecteurs pCRII-Promoteur et pYG1018 sont digérés par 60 unités de HindIII et de
15 MluI. Après migration sur gel d'agarose à 0,8%, la bande correspondant au promoteur PDC1 (environ 1,2 kb), la bande correspondant à la partie vecteur (environ 9 kb) et la bande correspondant au cDNA de l'albumine (environ 2 kb) sont électroéluées. Une ligation à 3 partenaires (suivant les recommandations de tampon et de températures définies par le fournisseur
20 New England Biolabs) est ensuite effectuée avec 1 µl d'ADN promoteur, 1 µl d'ADN vectoriel, et 2 µl d'ADN albumine. Après transformation chez E.coli (Chung et al NAR 16 (1988) 3580), l'ADN plasmidique des transformants est préparé selon la technique de lyse alcaline au SDS de Birboim et Doly (NAR 6 (1979) 1513) modifiée par Ish-Horowicz et Burke (NAR 9 (1981) 2989).
25 Après digestion enzymatique, le plasmide possédant le bon profil de restriction est isolé. Ce plasmide est désigné pYG181.

La souche K.lactis CBS 293.91 a été transformée par pYG181 dans les conditions décrites dans l'exemple II. La production d'albumine par plusieurs transformants est testée selon la technique décrite dans EP 361 991. La
30 quantité d'albumine sécrétée par les transformants est similaire (50-100 mg/l).

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: RHONE-POULENC RORER S.A.
- (B) RUE: 20, avenue Raymond ARON
- (C) VILLE: ANTONY
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 92165

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Promoteur de levure et son utilisation.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 3

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Tape
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1239 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucleique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: lineaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Kluyveromyces lactis

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLACEMENT: 1177..1239

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

AAGCTTCCAG TCACATGACC TAGAATGCAT ATATTGTCCC GGGTAATATA TAGCAACCGT	60
CTTCTCTCTG CTTATCTCTG GTGCAGCCTC CTAGTTTTTC CGAAAAGTTT CTTTTTCTCC	120
AAAATTCTCC GAAAATCGTC AGATATCCAG ATATGCAACA TAGAGGGAAG ATACACCGTT	180
ATATCGATTT CAAAATGCAA ATAACGGCAA CTAAGCCCAT CACTCTCAGC ACGTTTCTTT	240
TCCATGCACG TCGTTCCCAC TGATGATTCC TCGGATCAGT TGATGCGATT TTTAACAACA	300
GCCAAAGCAG ACATCCTCCA AGCCGTATCC CAGACAAATA CAACTCTATC TCTGTGAGGG	360

16

```

ATTCGTGTAA ACTGGAATTC AGCTGAGGTA TTTCTTTTAA CAGGATTGCG CTTCCAGTAA      420
ATTCGGTCTG TTCCATTGCG ACTTGTGAA TGGCATTGGC GATGCCAATC GCAATTCCAT      480
GGGCAACGAG TAAGTAAGTC TCTTCTACAT CGTCCTATTC CTTTCCTAAT GTGAGCTCTT      540
TTTACCTTTT GGTACCCATA CAACGAGTGT CATGGGGAGA GGAAGAGGAA GATTTTAGAT      600
GTAGTGAAAG TGAATAGATG AAATGGGAAA TGGGCGTGTG GTGCGGTTTC TGTGGTATAG      660
AAAATCGGAA ATGAGAGTCA ACCAAGGTAA AAGGTGGGAT AATTTTCATGG TATTGGAAAT      720
TATTCAAATT AGCTAACCAT TGCTGGCCCT TGTGCGTGTC CTGTATTTTG CATATTCTGT      780
ATTTGCTATG TAGAACCATG GGATAGATTA TGCAATATTT GTGAAAAGAT TCAACCTTTT      840
AAGGTGTATA CGTAGTATTG GCCCATGAAT ATCTTAAGGT TGAATAGTA GTACCACTTG      900
TGTCATTAT CCATTAAGGG GGGAGAGTGA GGTGAGAGGC AGGGCTGGCT GGGTGGTGAA      960
TATGACCTTT CTATTTTTTT TAGTTAACTC AGATAAAGTA TAAATACATG GGCATGATTA     1020
TCTGTAATGG CTAGAGTTTC CCATCATGTC TTAATCATAA TCTTAATTAT ATACTTTTGA     1080
TTACCCCTCAA AAACCATCCA CTAAAGCCAA ACATATTATA GTATTAACCTA TTAATATTAA     1140
GGATAAAACT ACAACTCAAA ACCAACTTAA ATTACA ATG TCT GAA ATT ACA TTA      1194
                               Met Ser Glu Ile Thr Leu
                               1           5

GGT CGT TAC TTG TTC GAA AGA TTA AAG CAA GTC GAA GTT CAA ACC      1239
Gly Arg Tyr Leu Phe Glu Arg Leu Lys Gln Val Glu Val Gln Thr
                10                15                20

```

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 19 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

CTGTTTCATT TGAAGCGCG

19

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 1184 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucleique
 (C) NOMBRE DE BRINS: double
 (D) CONFIGURATION: lineaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Kluyveromyces lactis

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

ACGCGTGTCTG ACAGCTTCCA GTCACATGAC CTAGAATGCA TATATTGTCC CGGGTAATAT	60
ATAGCAACCG TCTTCTCTCT GCTTATCTCT GGTGCAGCCT CCTAGTTTTT CCGAAAAGTT	120
TCTTTTTCTC CAAAATTCTC CGAAAATCGT CAGATATCCA GATATGCAAC ATAGAGGGAA	180
GATACACCGT TATATCGATT TCAAAATGCA AATAACGGCA ACTAAGCCCA TCACTCTCAG	240
CACGTTTCTT TTCCATGCAC GTCGTTCCCA CTGATGATTC CTCGGATCAG TTGATGCGAT	300
TTTAAACAAC AGCCAAAGCA GACATCCTCC AAGCCGTATC CCAGACAAAT ACAACTCTAT	360
CTCTGTGAGG GATTCGTGTA AACTGGAATT CAGCTGAGGT ATTTCTTTTT ACAGGATTGC	420
GCTTCCAGTA AATTCGGTCT GTTCCATTGC GACTTGTTGA ATGGCATTGG CGATGCCAAT	480
CGCAATTCCA TGGGCAACGA GTAAGTAAGT CTCTTCTACA TCGTCCTATT CCTTTCCTAA	540
TGTGAGCTCT TTTTACCTTT TGGTACCCAT ACAACGAGTG TCATGGGGAG AGGAAGAGGA	600
AGATTTTAGA TGTAGTGAAA GTGAATAGAT GAAATGGGAA ATGGGCGTGT GGTGCGGTTT	660
CTGTGGTATA GAAAATCGGA AATGAGAGTC AACCAAGGTA AAAGGTGGGA TAATTTTCATG	720
GTATTGGAAA TTATTCAAAT TAGCTAACCA TTGCTGGCCC TTGTGCGTGT CCTGTATTTT	780
GCATATTCTG TATTTGCTAT GTAGAACCAT GGGATAGATT ATGCAATATT TGTGAAAAGA	840
TTCAACCTTT TAAGGTGTAT ACGTAGTATT GGCCCATGAA TATCTTAAGG TTGGAATAGT	900
AGTACCACTT GTGTCAATTA TCCATTAAGG GGGGAGAGTG AGGTGAGAGG CAGGGCTGGC	960
TGGGTGGTGA ATATGACCTT TCTATTTTTT TTAGTTAACT CAGATAAAGT ATAAATACAT	1020
GGGCATGATT ATCTGTAATG GCTAGAGTTT CCCATCATGT CTTAATCATA ATCTTAATTA	1080
TATACTTTTG ATTACCCTCA AAAACCATCC ACTAAAGCCA AACATATTAT AGTATTAAC	1140
ATTAATATTA AGGATAAAAC TACAAC TCAA AACCAACTAA GCTT	1184

REVENDICATIONS

1. Fragment d'ADN comprenant tout ou partie de la séquence SEQ ID n° 1 ou de son brin complémentaire, ou d'un dérivé de celles-ci, et possédant une activité de promoteur transcriptionnel.

2. ADN recombinant comprenant une séquence d'ADN selon la revendication 1.

3. ADN recombinant selon la revendication 2 caractérisé en ce qu'il contient en outre un ou plusieurs gènes de structure.

4. ADN recombinant selon la revendication 3 caractérisé en ce qu'il contient également des signaux permettant la sécrétion du produit d'expression du ou desdits gènes de structure.

5. ADN recombinant selon les revendications 3 et 4 caractérisé en ce que le ou les gènes de structure codent pour des protéines d'intérêt pharmaceutique ou agroalimentaire.

6. ADN recombinant selon la revendication 5 caractérisé en ce que le ou les gènes de structure codent pour des protéines choisies parmi les enzymes (tels que notamment la superoxide dismutase, la catalase, les amylases, les lipases, les amidases, la chymosine etc.), les dérivés sanguins (tels que la sérum-albumine, l'alpha- ou la bêta-globine, le facteur VIII, le facteur IX, le facteur de von Willebrand, la fibronectine, l'alpha-1 antitrypsine etc.), l'insuline et ses variants, les lymphokines (telles que les interleukines, les interférons, les facteurs de stimulation des colonies (G-CSF, GM-CSF, M-CSF...), le TNF, le TRF etc.), les facteurs de croissance (tels que l'hormone de croissance, l'érythropoïétine, le FGF, l'EGF, le PDGF, le TGF etc.), les apolipoprotéines, des polypeptides antigéniques pour la réalisation de vaccins (hépatite, cytomégalovirus, Eppstein-Barr, herpes etc.), ou encore des fusions de polypeptides telles que notamment des fusions comportant une partie active fusionnée à une partie stabilisatrice (par exemple des fusions entre l'albumine ou des fragments d'albumine et le récepteur ou une partie d'un récepteur de virus (CD4, etc.)).

7. ADN recombinant selon l'une quelconque des revendications 2 à 6 caractérisé en ce qu'il fait partie d'un plasmide d'expression, qui peut être à répllication autonome ou intégratif.

8. Cellule recombinée contenant une séquence d'ADN ou un ADN recombinant selon l'une quelconque des revendications précédentes.

9. Cellule recombinée selon la revendication 8 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une levure.

10. Cellule recombinée selon la revendication 9 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une levure du genre *Kluyveromyces*.

11. Utilisation d'une séquence d'ADN selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 pour l'expression de gènes recombinés.

12. Utilisation selon la revendication 11 pour l'expression de gènes codant pour des protéines d'intérêt pharmaceutique ou agroalimentaire.

13. Procédé de production de protéines recombinantes caractérisé en ce que l'on cultive une cellule recombinée selon l'une quelconque des revendications 8 à 10 et on récupère les protéines produites.

14. Procédé selon la revendication 13 pour la production de protéines d'intérêt pharmaceutique ou agroalimentaire.

15. Procédé selon la revendication 14 caractérisé en ce que la protéine est préférentiellement la sérum-albumine humaine ou un de ses variants moléculaires.

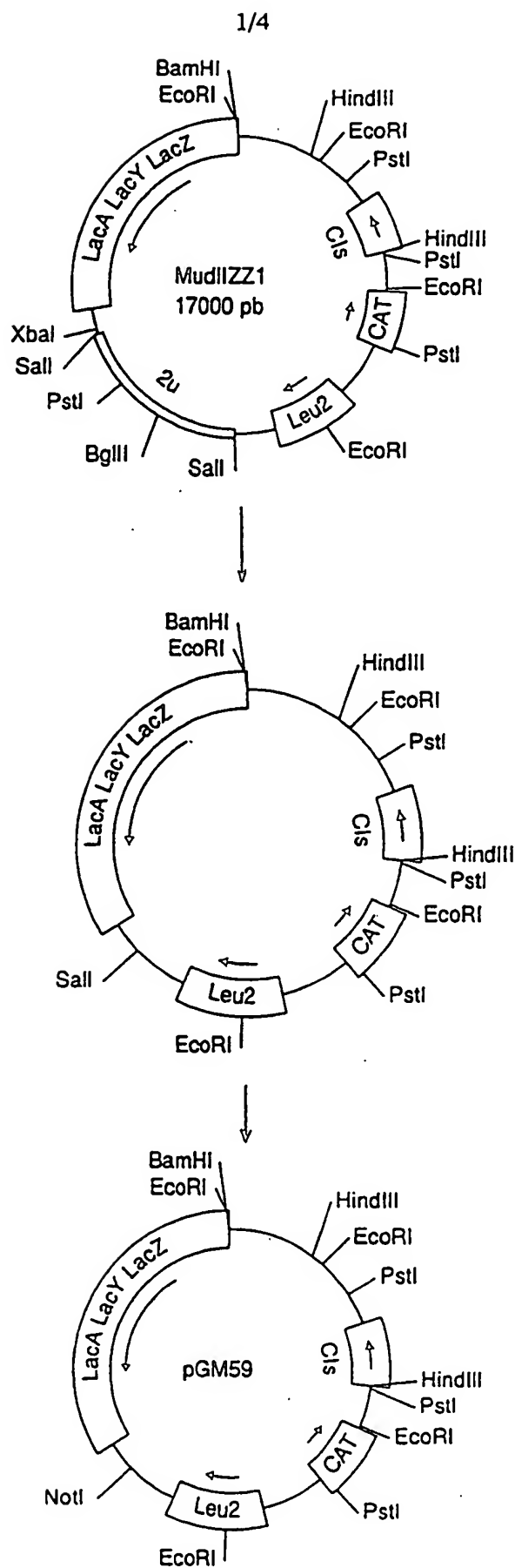


Figure 2a

2/4

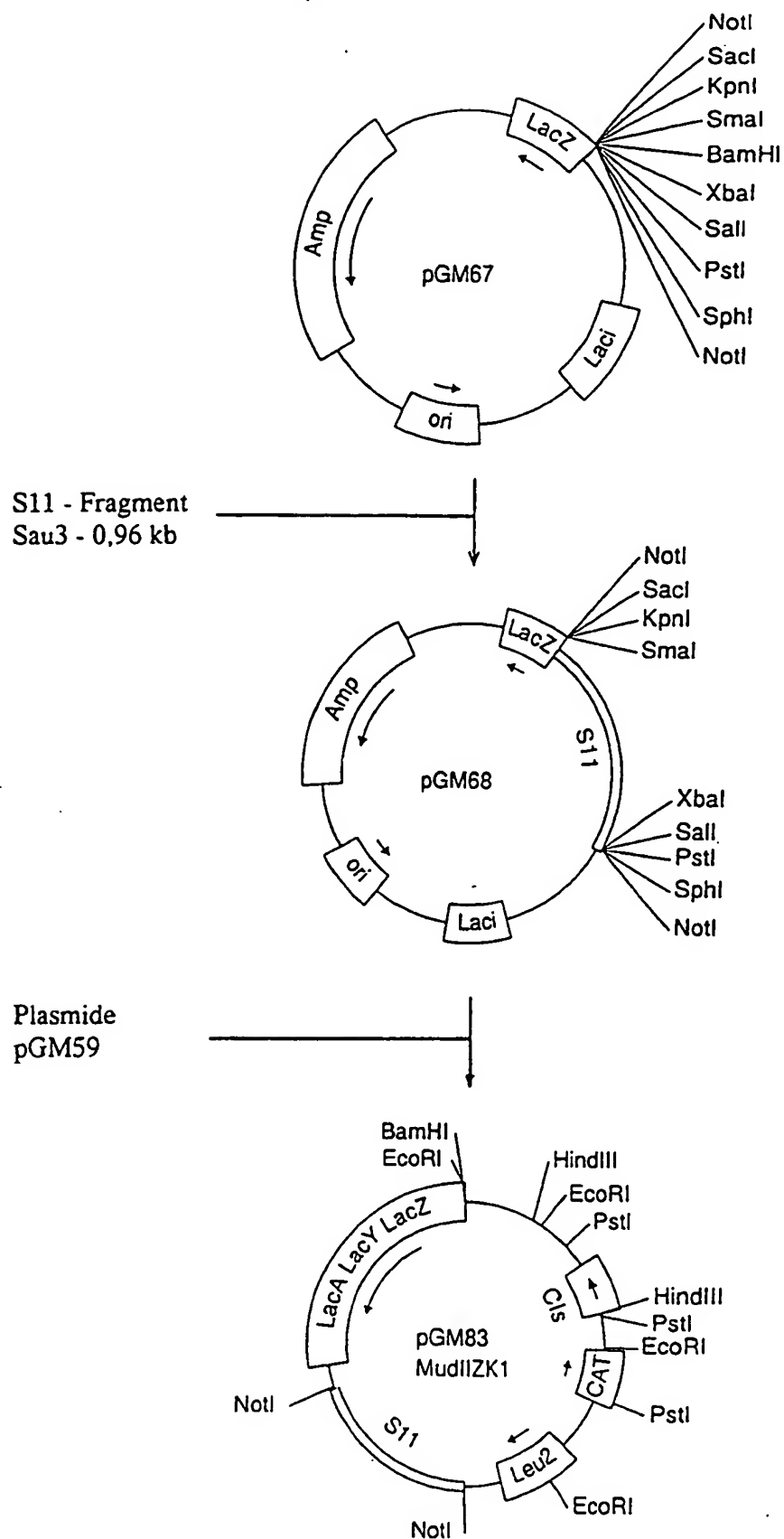


Figure 2b

FEUILLE DE REMPLACEMENT

3/4

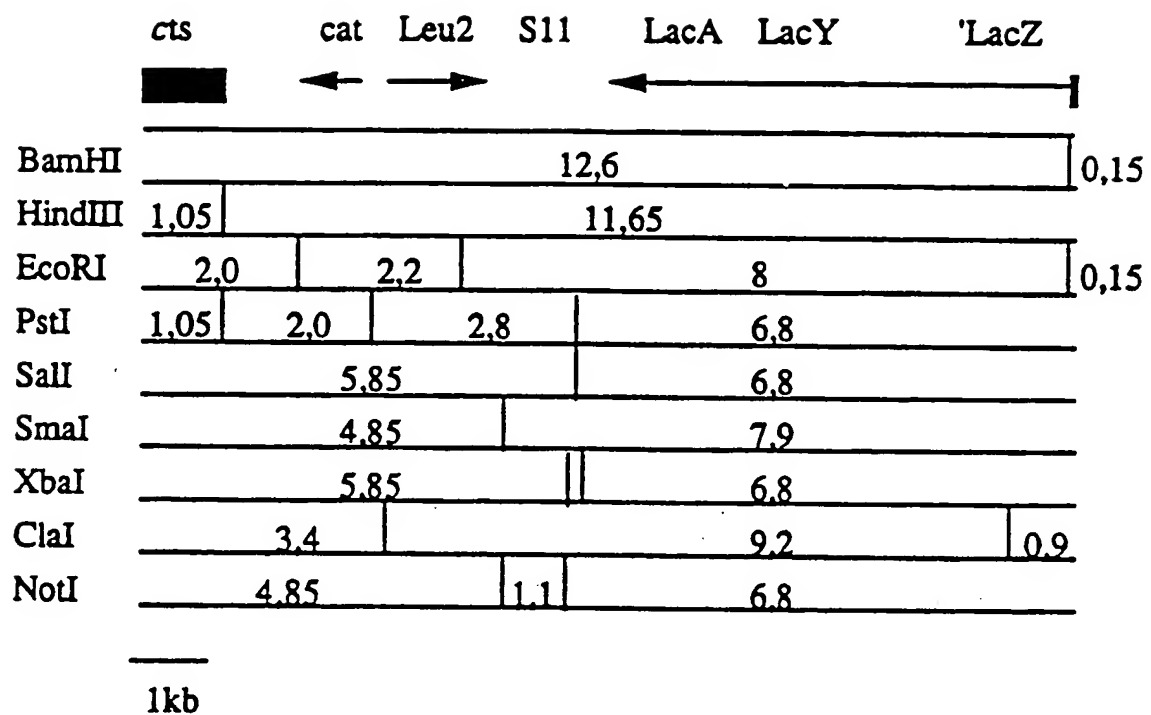


Figure 3

4/4

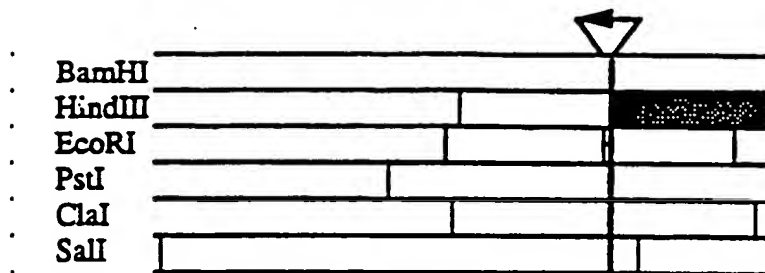


Figure 4

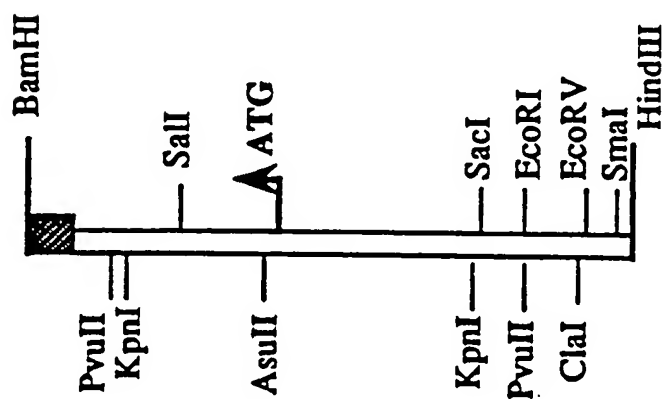


Figure 5

FEUILLE DE REMPLACEMENT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 93/00694

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁵ C12N15/81; C12N15/62; C12N15/14; C12N15/60
C12N1/21; //C12N15/19, (C12N1/21, C12R1:645)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁵ C12N; C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP,A,0361991 (RHONE-POULENC SANTE) 4 April 1990, cited in the application see the whole document ---	1-15
A	JOURNAL OF BASIC MICROBIOLOGY Vol.28, No.4, 1988, BERLIN, DE pages 211 - 220 CHEN, X.J. ET AL. "A gene-cloning system for Kluyveromyces lactis and isolation of a chromosomal gene required for killer toxin production" cited in the application see the whole document ---	
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH Vol.14, No.22, 1986, ARLINGTON, VIRGINIA US pages 8963 - 8977 KELLERMANN, E. ET AL. "Analysis of the primary structure and promoter function of a pyruvate decarboxylase gene (PDC1) from Saccharomyces	

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

06 October 1993 (06.10.93)

Date of mailing of the international search report

15 October 1993 (15.10.93)

Name and mailing address of the ISA/

EUROPEAN PATENT OFFICE

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR 93/00694

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	<p>cerevisiae" see page 8969, line 9 - page 8973, line 8 -----</p>	

FR 9300694
SA 76215

06/10/93

EPO FORM 1007

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB 5 C12N15/81; C12N1/21;	C12N15/62; //C12N15/19, (C12N1/21, C12R1:645)	C12N15/14; C12N15/60
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB 5	C12N ; C07K	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté		
III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie ⁹	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
A	EP, A, 0 361 991 (RHONE-POULENC SANTE) 4 Avril 1990 cité dans la demande voir le document en entier ----	1-15
A	JOURNAL OF BASIC MICROBIOLOGY vol. 28, no. 4, 1988, BERLIN, DE pages 211 - 220 CHEN, X.J. ET AL. 'A gene-cloning system for Kluyveromyces lactis and isolation of a chromosomal gene required for killer toxin production' cité dans la demande voir le document en entier ----- -/-	
<p>⁹ Catégories spéciales de documents cités:¹¹</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>"&" document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
06 OCTOBRE 1993		15. 10. 93
Administration chargée de la recherche internationale		Signature du fonctionnaire autorisé
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS		ANDRES S.M.

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁴		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUEES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie *	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
A	<p>NUCLEIC ACIDS RESEARCH vol. 14, no. 22, 1986, ARLINGTON, VIRGINIA US pages 8963 - 8977 KELLERMANN, E. ET AL. 'Analysis of the primary structure and promoter function of a pyruvate decarboxylase gene (PDC1) from Saccharomyces cerevisiae', voir page 8969, ligne 9 - page 8973, ligne 8</p> <p>-----</p>	

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9300694
SA 76215

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

06/10/93

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0361991	04-04-90	FR-A- 2635115	09-02-90
		FR-A- 2649991	25-01-91
		AU-B- 623425	14-05-92
		AU-A- 3933289	08-02-90
		JP-A- 2276589	13-11-90
